



TITLE:

計画:11-3 FISH法を用いた霊長類の核型進化に関する研究および霊長類細胞株作成の試みⅡ(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

田辺, 秀之; 水沢, 博

CITATION:

田辺, 秀之 ...[et al]. 計画:11-3 FISH法を用いた霊長類の核型進化に関する研究および霊長類細胞株作成の試みⅡ(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 1994, 24: 72-73

ISSUE DATE:

1994-11-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/164566>

RIGHT:

ルを含む他の10種)であった。B・C間は調べた25-26個の制限酵素サイト中、3-4個の変異が認められ、A・(BC)間は5-6個であった。同一グループ内の種間では0.5-2個のサイトの変異が認められた。大型類人猿の場合ではサイトひとつの変異は50万年の分岐時間に相当したが、これをあてはめると、A・(BC)間の分岐はヒト・ゴリラの分岐と同等の時期であろうと推定された。スラウェシ島の7種のマカクはそれぞれ別々の交配集団を形成しているものと示唆されたが、分布の境界領域で交雑が起きているか否か、大陸産のブタオザル集団との関連等については今後の問題である。またニホンザルについては本土由来の個体のゲノム内のrDNAコピーの約半分で、屋久島由来の個体にはみられない、特異的なサイトの変異が認められた。この変異が亜種間のものとして再現性があるのかについては今後の課題である。

計画：11-2

ミトコンドリアDNA変異の解析によるマカク属サルの系統についての研究

針原伸二(東京大・院・理・人類)

インドネシア・スラウェシ島のマカク属サルは7種に分類され、それぞれ独自の分布域を有している。異なる2種の接する境界領域においては、雑種とみられる個体がしばしば観察されることが知られているが、今回の研究では島の北部のM.heckiとM.tonkeanaの2種が接するところで採取された試料を用いて、ミトコンドリアDNA(mtDNA)の変異を解析し、雑種形成の実態や種分化の進行などについて検討することとした。サルの血液試料は互いに数Kmの範囲にある4地点で計51頭より採取され、DNAが通常法により抽出された。抽出したDNAを10種の制限酵素、BamHI、BglII、EcoRI、EcoRV、HindIII、HpaI、PstI、PvuII、SacI、XbaIにて切断し、mtDNAの切断パターンをSouthern法にて検出し、既知のスラウェシマカクのパターン(モルフ)と比較した。

その結果、これらの個体の切断パターンには、まったく変異がなく、同一のmtDNAタイプと判定された。いずれの制限酵素のパターンも、M.tonkeanaとM.heckiどちらにもみられるもの

であったが、すべてのパターンを組み合わせたタイピングでは、4群51頭のmtDNAタイプは、これまでどのスラウェシマカクでもみられないものである。

このmtDNAタイプがどちらの種に属するものかは判断しがたいが、BglIIやXbaIのモルフや、その他の既知のmtDNAタイプとの距離などを考慮すると、M.heckiのmtDNAタイプと思われた。4群は地理的には近接した位置に分布していることもあり、母系では均一的な遺伝構成を持っていると推測された。

計画：11-3

FISH法を用いた霊長類の核型進化に関する研究および霊長類細胞株作成の試みII

田辺 秀之・水沢 博

(国立衛試・変異遺伝・細胞バンク)

平成4年度に引き続き、染色体バンディング法とFISH(Fluorescence In Situ Hybridization)法とを組み合わせることにより、ヒトと霊長類の遺伝子比較マッピングを行い、遺伝子座の位置に基づいた核型進化を考察することを目的とした。プローブDNAとしてヒト14q32.33に位置する免疫グロブリンCε1遺伝子およびヒト9q24.2-q24.1に位置するその偽遺伝子であるCε3遺伝子を用いた。Cε1遺伝子を含む免疫グロブリンCH遺伝子領域は、霊長類の進化の過程でダイナミックな重複、欠失などのDNAレベルでの再編成が生じてきたことが知られており、本研究ではこの領域の染色体レベルでの再編成の有無を7種(チンパンジー、ピグミーチンパンジー、オランウータン、シロテテナガザル、アジルテナガザル、ニホンザル、スラウェシマカク)の霊長類について調べた。PHA-MまたはCon-Aをmitogenとした全血培養法により各種霊長類の染色体標本作製し、Q分染像を写真撮影した後にFISH法を行った。撮影したQ分染像と同じ分裂像のFISHのシグナル部位とを比較した。ヒト14番および9番染色体に特異的なペインティングプローブを併用した結果、Cε1およびCε3遺伝子ともにそれぞれヒト14番および9番染色体にペインティングされる霊長類染色体領域上にマッピングされた。すなわち、これらの遺伝子座はヒトの遺伝子座と対応する位置に存在し、核型進化上、高度に保存されているこ

とが明らかとなった。従って、霊長類の進化の過程で、DNAレベルでの重複、欠失などのダイナミックな再編成が生じてきた領域は、必ずしも染色体レベルでの再編成(転座など)を伴うのではなく、両者は独立して生じ得るものだと考えられる。

また霊長類細胞株の作製を試みた結果、EBVにより5種(チンパンジー、シロテテナガザル、アジルテナガザル、コマンモーモセット、ワタボウシタマリン)の霊長類由来のLCLが作成できた。さらに同5種とニホンザル、ケナガクモザル、フサオマキザルから monocyte/macrophage系の細胞群を分離し、凍結保存を行った。

計画: 11-4

霊長類の P117 プロセスト遺伝子について

竹中 晃子(名古屋文理短期大学)

目的 霊長類にはプロセスト遺伝子として Alu エlement, L1 エlementなどが散在し、これらの間の不等交叉により遺伝子の組換えが起きている。マカクの α -グロビン領域に見いだされた P117 プロセスト遺伝子の他の霊長類における存在様式、本来の遺伝子の機能等について調べ、プロセスト遺伝子としての出現機構について考察する。

結果及び考察

1) ヒトの P117 プロセスト遺伝子を PCR法により増幅し精製後、ダイレクトシーケンス法により決定できた塩基配列 135bp はカニクイザルの p117 プロセスト遺伝子と全く同じであった。ヒトとカニクイザルでは α -グロビン遺伝子における点突然変異率は約 8% である。プロセスト遺伝子は機能がないために、突然変異率は高くなるはずであり、135bp のうち 10bp 以上が変異していてもよいことになる。本来の P117 遺伝子が非常に重要な機能を有しているために変異を許容できないか、あるいはウイルスなどの媒介によってプロセスト遺伝子として同時多発的に各種動物に挿入されたか等が考えられるが、今後各種霊長類、さらに他の分類群の動物についても検討を加えたい。

2) カニクイザルの P117 プロセスト遺伝子を含む断片を NcoI および NaeI 切断後、強力な Tac プロモーターを有する発現ベクター pMEX の NcoI

部位に挿入し、大腸菌 XLIB を形質転換させた。IPTG で誘導をかけると大腸菌のタンパク質とは異なるタンパク質が発現していることが明らかになった。今後このタンパク質を精製し抗体を作成し細胞内の分布について検討する。

3) スラウェシマカク 35 頭について BamHI で切断後サザンハイブリダイゼーションを行い、 α -グロビン領域への P117 遺伝子の挿入頻度を調べたところブルネッセンズ 1 頭のみに挿入されていた。大陸部に生息するアカゲサルやカニクイザルにおいて挿入頻度は、一部の地域では 50-60% にもなるが、他の地域では約 20-30% であった。ニホンザルでは 0%, セレベスマカクでも頻度は非常に低い。

以上のことから P117 のプロセスト遺伝子としての出現時期については今後の検討が必要である。

計画: 11-5

霊長類における涙液および唾液の蛋白多型

松島芳文(埼玉県立がんセンター研究所・実験動物研究室)

涙液と唾液のタンパク多型に関しては、すでにヒトおよび嚙歯類について多くの報告がある。本研究では原猿から類人猿までの分類群をできるだけ広範囲に調査し、霊長類の涙液および唾液タンパク多型に関する全体的傾向を把握することを目的とする。

今年度は、ニホンザル若桜群 44 頭および嵐山群 48 頭の涙液および唾液タンパク多型について検索した。試料はいずれも 2 × 5 mm の濾紙片に吸着採取し、そのまま pH8.0, 10% PAG 電気泳動に用いた。涙液タンパク多型は、泳動域のほぼ中央付近のバンドに多型が検出された。移動度差による F(fast) 型, S(slow) 型およびバンドを発現しない O(null) 型が認められ、若桜群における表現型頻度は F 型 47.5%, FS 型 50.0%, S 型 2.5%, O 型 0% であり、嵐山群では F 型 50.0%, FS 型 31.2%, S 型 14.6%, O 型 4.2% であった。また左右眼よりそれぞれ採取した雌ニホンザル涙液の泳動像に、嚙歯類で認められた X 染色体の不活性化現象による左右眼での泳動像のモザイク現象を検索したが認められなかった。一方、唾液タンパクには多型が検出されなかったが、唾液アミラーゼ型に移動度差による F(fast) および